

## **ЭВОЛЮЦИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗАХ VI И IX ТИПОВ**

*Белорусский государственный медицинский университет*

Изучена скорость филогенетических изменений первичной структуры аденилатциклаз VI и IX типов. Скорость эволюции аденилатциклаз VI и IX типов является постоянной в разных филогенетических линиях позвоночных животных, но отличается по абсолютной величине. На ранних стадиях филогенеза (у многоклеточных беспозвоночных) аденилатциклазы VI и IX типов изменялись почти в 2 раза быстрее.

**Ключевые слова:** аденилатциклаза, молекулярная эволюция, эволюционные часы

Studies have been made of the rate of phylogenetic changes in the primary structure of adenylyl cyclases of VI and IX types. The rate of evolution of adenylyl cyclases of VI and IX types is constant in different phylogenetic lines of vertebrates, but differs from each other in absolute magnitude. In early stages of evolution (in multicellular invertebrates) adenylyl cyclases of VI and IX types changed almost two times quicker. Key words: adenylyl cyclase, molecular evolution, evolutionary clock

Трансмембранная передача сигнала многих гормонов, нейромедиаторов и других регуляторных молекул, участвующих в управлении процессов метаболизма, пролиферации и дифференцировки клеток в органах и тканях, осуществляется через каскад рецептор /G белок/ аденилатциклаза. Известно, что развитие многих патологических и физиологических изменений в органах и системах организма сопровождается значительными перестройками в их гормональной регуляции на уровне этого каскада.

Для понимания общих принципов функционирования, развития и становления гормонкомпетентных систем важное значение имеет изучение их формирования у организмов разных уровней филогенеза.

Цель настоящей работы – сравнительное исследование скоростей молекулярной эволюции мембраносвязанных аденилатциклаз VI и IX типов (АЦ VI и АЦ IX) животных, находящихся на разных уровнях филогенеза.

**Материал и методы**

Нами проведен анализ различий первичной структуры мембраносвязанной АЦ IX у пяти видов животных, находящихся на разных уровнях эволюционного развития: представителей двух отрядов млекопитающих (грызуны – *Mus musculus*, приматы – *Homo sapiens*), птиц (*Gallus gallus*), амфибий (*Xenopus laevis*) и насекомых (*Drosophila melanogaster*). Анализ различий первичной структуры мембраносвязанной АЦ VI проведен также у пяти видов животных: представителей трех отрядов млекопитающих (хищные – *Canis familiaris*, грызуны – *Mus musculus*, приматы – *Homo sapiens*), рыб (*Takifugu rubripes*) и насекомых (*Drosophila melanogaster*). Выравнивание аминокислотных последовательностей проводилось с помощью программы CLUSTAL W [8].

Среднее число аминокислотных замен, приходящихся на пару гомологичных сайтов двух сравниваемых полипептидов ( $K_{aa}$ ), рассчитывали по формуле:

$$K_{aa} = -\ln(1 - Pd - 1/5Pd^2),$$

где  $Pd = daa/naa$  – доля аминокислотных различий,  $naa$  – полное число аминокислотных сайтов, по которым сравниваются две гомологичные белковые последовательности,  $daa$  – число отличающихся друг от друга сайтов. При подсчете числа различий участки, не имеющие соответствия с одной из сопоставляемых последовательностей («пробелы») и возникшие в результате вставок и делеций, не рассматривались.

Скорость эволюционных замен аминокислот на сайт в год вычисляли по формуле:

$$k_{aa} = K_{aa}/2T,$$

где  $T$  – число лет, прошедших после эволюционной дивергенции двух цепей от общей для них предковой цепи; множитель 2 в знаменателе соответствует двум ветвям подразумеваемого филогенетического древа.

#### Результаты и их обсуждение

Согласно данным об эволюции животных, позвоночные и беспозвоночные дивергировали около 500 млн. лет назад [6]. Костные рыбы известны с нижнего девона, около 410 млн. лет назад [1, 3]. Амфибии произошли приблизительно около 300 млн. лет назад [5], а птицы – около 150 млн. лет назад [2]. Дивергенция грызунов и человека произошла в конце мезозоя, около 80 млн. лет назад [6], а хищных и человека – в верхнем эоцене, около 50 млн. лет назад [1, 4]. В таблице 1 приведены оценки аминокислотных различий, полученные при попарных сравнениях АЦ IX у разных организмов. Из данных, представленных в таблице 1, можно сделать вывод о существовании четкой взаимосвязи между временем дивергенции и степенью аминокислотных различий.

Таблица 1

**Различия между аминокислотными последовательностями (в %) аденилаткинолазы IX типа разных животных**

	Дрозофила	Лягушка	Фазан	Мышь	Человек
Дрозофила	0,0	63,2	64,0	64,0	63,0
Лягушка		0,0	27,1	28,4	29,4
Фазан			0,0	19,5	20,3
Мышь				0,0	9,0
Человек					0,0

Эта взаимосвязь становится еще более отчетливой, если вместо простых различий в процентах мы рассмотрим расчетные оценки числа аминокислотных замен ( $K_{aa}$ ), действительно происшедшие в ходе эволюции (рис. 1).

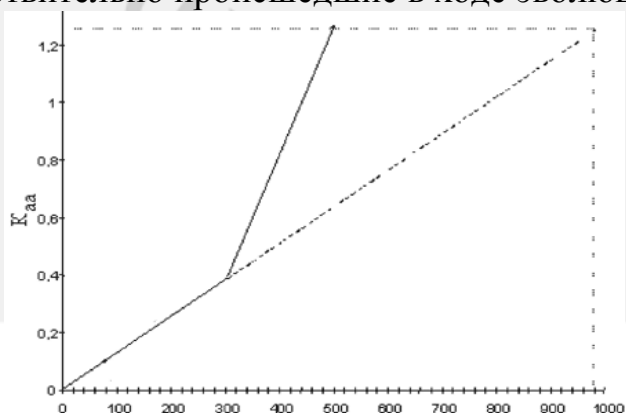


Рис.1. Зависимость между Каа (числом аминокислотных замен) и временем дивергенции (в миллионах лет) мембраносвязанной аденилатциклазы IX типа у животных различных видов

На рисунке 1 приведен график, на котором точки соответствуют расчетным значениям числа аминокислотных замен (Каа), приуроченным к соответствующим временам дивергенции Т. Так, точка под номером 1 отвечает среднему значению Каа, полученному при сравнении первичной структуры АЦ IX дрозофилы с таковой четырех других животных. Аналогичным образом точка 2 – это среднее значение Каа, полученное при сравнении аденилатциклазы лягушки с аденилатциклазами фазана, мыши и человека; точка 3 – результат сравнения аденилатциклазы фазана с аденилатциклазами мыши и человека, а точка 4 – аденилатциклаз мыши и человека. Из рисунка 1 видно, что точки 2–4, т.е. точки, соответствующие различным видам позвоночных животных, хорошо ложатся на прямую. Наклон этой прямой равен 0,0012; следовательно,  $каа = Каа/2Т \gg 0,60 \cdot 10^{-9}$  на аминокислотный сайт в год. Таким образом, можно полагать, что эволюция мембраносвязанных АЦ IX позвоночных происходила примерно с постоянной (одинаковой) скоростью, равной  $0,60 \cdot 10^{-9}$  на сайт в год. В таблице 2 приведены оценки аминокислотных различий, полученные при попарных сравнениях АЦ VI у различных организмов, из которых также следует четкая взаимосвязь между степенью аминокислотных различий и временем дивергенции.

Таблица 2

**Различия между аминокислотными последовательностями (в %) аденилатциклазы VI типа разных животных**

	Дрозофила	Рыба	Мышь	Собака	Человек
Дрозофила	0,0	56,9	55,1	54,9	55,2
Рыба		0,0	27,8	28,1	27,7
Мышь			0,0	7,1	5,6
Собака				0,0	4,1
Человек					0,0

На рисунке 2 приведен график, на котором расчетные значения Каа приурочены к соответствующим временам дивергенции. Точка 1 отвечает среднему значению Каа, полученному при сравнении первичной структуры АЦ VI дрозофилы с таковой четырех других животных. Точка 2 – это среднее значение Каа, полученное при сравнении аденилатциклазы рыбы с аденилатциклазами мыши, собаки и человека, точка 3 – результат сравнения аденилатциклазы мыши с аденилатциклазами собаки и человека, а точка 4 – аденилатциклаз собаки и человека.

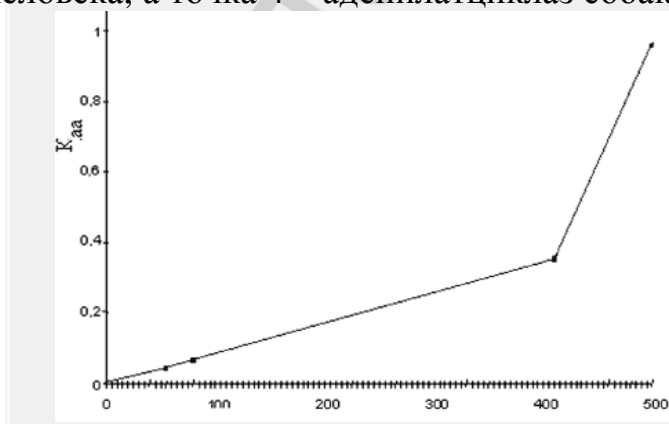


Рис.2. Зависимость между  $K_{aa}$  (числом аминокислотных замен) и временем дивергенции (в миллионах лет) мембраносвязанной аденилатциклазы VI типа у животных различных видов

Из рисунка 2 следует, что наклон прямой, проходящей через точки, соответствующие различным видам позвоночных животных (точки 2–4), равен 0,00084; следовательно,  $k_{aa} \approx 0,42 \cdot 10^{-9}$  на аминокислотный сайт в год. Эти данные позволяют считать, что эволюция мембраносвязанных аденилатциклаз VI и IX типов у позвоночных животных происходила примерно с постоянной, хотя и разной скоростью. Так, скорость эволюции АЦ IX у позвоночных ( $0,60 \cdot 10^{-9}$  на сайт в год) была почти в 1,5 раза больше, чем у АЦ VI ( $0,42 \cdot 10^{-9}$  на сайт в год).

Примерное постоянство темпов аминокислотных замен обнаруживается также при сравнении цитохромов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобинов [6]. На основании подобных данных была сформулирована доктрина о постоянстве скоростей молекулярной эволюции, утверждающей, что для любого данного белка скорость изменения постоянна или почти постоянна во времени [6,9]. Термин «молекулярные часы» отражает эту предполагаемую размеренность молекулярной эволюции. Полное или почти полное постоянство скоростей молекулярной эволюции Кимура [6] рассматривает как веский аргумент в пользу теории нейтральности. Это постоянство трудно было бы объяснить, если считать, что молекулярные изменения контролируются отбором; если же считать, что они селективно нейтральны и фиксируются дрейфом генов, то оно соответствует ожиданиям [6].

Если считать концепцию о постоянстве скоростей молекулярной эволюции абсолютной и экстраполировать среднюю скорость эволюции АЦ IX позвоночных в прошлое, как это сделано на рисунке 1, то дивергенция позвоночных и насекомых приходится на гораздо более раннее время, чем появление в палеонтологической лестнице первых остатков Metazoa, которые выступили на сцену примерно 850 млн. лет назад в протерозое [2]. При этом получается, что АЦ IX позвоночных дивергировала от гомолога АЦ IX насекомых около 980 млн. лет назад. Такая экстраполяция, естественно, приводит к сильно завышенным оценкам, поскольку остатки древнейших позвоночных известны из позднего кембрия (примерно 500 млн. лет назад) [7]. Из последней оценки сроков дивергенции позвоночных и беспозвоночных вытекает, что в период от 500 до 400 млн. лет назад скорость эволюции гомолога АЦ IX у дрозофилы была гораздо выше, чем впоследствии. Так, рассчитанное нами по формуле (1) для гомолога АЦ IX дрозофилы значение  $K_{aa} = 1,26$  (рис. 1). Отсюда следует, что гомолог АЦ IX дрозофилы эволюционировал практически в 2 раза быстрее АЦ IX позвоночных животных ( $k_{aa} = 1,26 / 1,0 \cdot 10^{-9} = 1,26 \cdot 10^{-9}$  на аминокислотный сайт в год). Аналогичные рассуждения, судя по данным табл.2, справедливы также для оценки скорости эволюции гомолога АЦ VI у дрозофилы ( $k_{aa} \approx 0,96 \cdot 10^{-9}$  на аминокислотный сайт в год).

Таблица 3

## Скорости эволюции различных белков млекопитающих

Белок	$k_{aa} \cdot 10^{-9}$ в год
Фибринопептиды	8,30
Панкреатическая рибонуклеаза	2,10
Лизоцим	2,00
$\alpha$ -Цепь гемоглобина	1,20
Многлобин	0,89
Инсулин	0,44
Цитохром С	0,30
Гистон Н4	0,01

В таблице 3 приведены значения скорости эволюции ( $k_{aa}$ ) для ряда белков млекопитающих [6]. Самая высокая скорость эволюции отмечается у фибринопептидов ( $k_{aa}=8,3 \cdot 10^{-9}$ ), а самая низкая – у гистона Н4 ( $k_{aa}=0,01 \cdot 10^{-9}$ ). Насколько представительны эти величины для всех генов млекопитающих, пока сказать трудно. Возможно, распределение частот этих скоростей не является нормальным, поэтому в качестве репрезентативной величины больше подходит медиана, а не среднеарифметическое [6]. Оказывается, что медиана скоростей эволюции шестидесяти белков, полученная Кимурой [6], равна  $0,74 \cdot 10^{-9}$  на аминокислотный сайт в год. Итак, можно сказать, что стандартная скорость молекулярной эволюции (скорость аминокислотных замен) примерно равна  $10^{-9}$  на сайт в год [6] и что темпы эволюции мембраносвязанных АЦ VI и АЦ IX позвоночных вполне репрезентативны.

## Выводы

Скорости эволюции АЦ VI и АЦ IX, выраженные через число аминокислотных замен в год, являются постоянными в разных филогенетических линиях позвоночных животных, хотя и отличаются по абсолютной величине. На ранних стадиях филогенеза (у многоклеточных беспозвоночных) молекулы мембраносвязанных аденилатциклаз изменялись почти в 2 раза быстрее.

## Литература

2. Грант В. Эволюционный процесс. – М., 1991. – 488 с.
3. Дольник В.Р., Козлов М.А. Рыбы. Атлас: Учебное пособие. – М., 2000. – 32 с.
4. Дольник В.Р., Козлов М.А. Млекопитающие. Атлас: Учебное пособие. – М., 2000. – 32 с.
5. Дольник В.Р., Козлов М.А. Земноводные и пресмыкающиеся. Атлас: Учебное пособие. – М., 2000. – 32 с.
6. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. – М., 1985. – 394 с.
7. Рэфф Р., Кофмен Т. Эмбрионы, гены и эволюция. – М., 1986. – 402 с.
8. Tompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions – specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res. – 1994. – Vol. 22. – P. 4673–4680.
9. Zuckerkandl E., Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins // In: Evolving Genes and Proteins. Bryson V. and Vogel H.J., eds. – New York, Academic Press, 1965. – P. 97–166.